Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 231-245

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد- تیر ۱۴۰۲ ص. ۲۴۵-۲۳۱

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Preparation of Liposomal Nanoparticles Containing *Ziziphora tenuir* Essential Oil and Evaluation of its Antimicrobial Effects

N. Jafarian[1], A. Akhondzadeh Basti[2]*, H. Emtiazi[3]

Received: 2021.09.03
Revised: 2021.12.17
Accepted: 2021.12.20
Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:
Jafarian, N., Akhondzadeh Basti, A., & Emtiazi, H. (2023). Preparation of liposomal nanoparticles containing *Ziziphora tenuir* essential oil and evaluation of its antimicrobial effects. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 19*(2), 231-245. http://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.72160.1085

Background and Objectives

Natural preservatives extracted from herbs are important sources for bioactive compounds that can be used in protection of food products. Essential oils are aromatic oily liquids, obtained from plant material like flowers, buds, seeds, leaves, and roots. Unfortunately, most natural compounds are biologically instable, poorly soluble in water and they distribute poorly to target sites. Currently, some novel methods have been introduced in order to improve their stability and their bioavailability, among which is the use of liposomal encapsulation. Microencapsulation reduces reactivity with the environment (water, oxygen, light), decreases the evaporation or the transfer rate to the outside environment, promotes handling ability, masks taste and enhances dilution to achieve a uniform distribution in the final product when used in very small amounts. Essential oils, as natural extracted compounds extracted from plants, are unstable compounds with low water solubility and unable to achieve target cells. Essential oils encapsulation by nanoliposomes is a novel method for increasing their biological activity and protecting them from destructive factors. The aim of this study was production and optimization of nanoliposomes containing *Z. teniur* essential oil and investigating their antibacterial effects against pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*).

Materials and Methods

Lipid film hydration method was used to produce nanoliposomes containing *Z. teniur* essential oil. Soy phosphatidylcholine and cholesterol were the main wall materials and chloroform was used as the mixing solvent . The particle size of nanoliposomes and their zeta-potential were investigated using laser diffraction method. In order to determine the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration of *Z. teniur* essential oil against examined bacteria, serial dilution method was used. Also, antioxidant activity of free and nano-encapsulated essential oil of *Z. teniur* was determined by DPPH method.

Results

According to the results, highest encapsulation efficiency achieved by using 80:20 ratio of soy phosphatidylcholine to cholesterol in nanoliposomes' wall structures. In general, by increasing the ratio of phosphatidylcholine to cholesterol, encapsulation efficiency was improved. Zeta-potential of nanoliposomes was equal to -5.3 mv and mean particle sizes were in the range of 94.7-119.9 nm. Results indicated that essential oil ejection from nanoliposomes has direct relation to the time of storage and after 30 hours, ejection rate will increase considerably. Ejection rate was higher in phosphate buffer pH=7.4 in comparison with phosphate buffer pH=5.4. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of free essential oil against *Escherichia coli* was 100 and 175 (μl/ml) respectively. Although,

1 and 2. Gratuated of Master of Science in Food Science and Technology and Professor, Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: akhondiafshin@gmail.com)
3- Research Expert, Faculty of Pharmacy, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
DOI: 10.22067/ifstrj.2021.72160.1085

Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of nanoliposomes containing *Z. teniur* essential oil were equal to 75 and 150 (µl/ml) respectively. Also, results shown that , minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of encapsulated *Z. teniur* essential oil against *Staphylococcus aureus* were lower in comparison with free form of *Z. teniur* essential oil. *Staphylococcus aureus* (as Gram-positive bacteria) was more susceptible than *Escherichia coli* (as Gram-negative bacteria).

Conclusion

Encapsulation of *Z. teniur* essential oil by nanoliposomes led to improve antibacterial effects of essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Also, investigating of antioxidant activity showed that encapsulated *Z. teniur* essential oil in nanoliposomes was more effective than free form of *Z. teniur* essential oil in scavenging of DPPH free radicals. Using nanoliposome encapsulation technology can be an effective way for increasing the efficiency of natural antibacterial compounds and essential oils encapsulated in nanoliposomes are suitable alternatives for synthetic preservatives used in food industry nowadays. The use of liposomes containing *Z. teniur* essential oil can provide the necessary protection against growth of spoilage and pathogenic microorganisms such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in food products.

Keywords: Antibacterial activities, Antioxidant properties, Encapsulation, Nanoliposome, *Z. teniur* essential oil

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 231-245

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲ ص. ۲۴۵-۲۳۱

مقاله پژوهشی

تهیه نانوذرات لیپوزومی حاوی اسانس کاکوتی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آن

نگین جعفریان[۱]- افشین آخوندزاده بستی[۲*]- حمیده امتیازی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۹/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹

چکیده

درون‌پوشانی اسانس‌ها درون لیپوزوم‌ها روشی نوظهور جهت افزایش فعالیت بیولوژیکی اسانس‌ها، حفاظت از آن‌ها در برابر عوامل مخرب محیطی و افزایش زیست دسترسی آن‌ها است. اسانس‌های گیاهی ترکیبات زیست‌فعال ناپایدار با کاربردهای تکنولوژیکی مختلف و با خواص سلامت‌بخش متنوع برای مصارف انسانی هستند. در پژوهش حاضر نانولیپوزوم‌های با دیواره از جنس فسفاتیدیل کولین سویا و کلسترول و حاوی اسانس کاکوتی با روش هیدراته کردن فیلم لایه نازک لیپیدی تهیه شد. اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها و پتانسیل زتا با استفاده از روش پراش نور لیزر بررسی شد. به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده اسانس در برابر باکتری‌ها، از روش رقت‌سازی در لوله آزمایش استفاده شد. همچنین، آزمایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال آزاد ۲،۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل انجام شد. نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که بالاترین راندمان درون‌پوشانی اسانس (۱/۸۲±۵۴/۴۱ درصد) درون نانولیپوزوم‌ها و حامل‌های بهینه با استفاده از نسبت ۸۰:۲۰ فسفاتیدیل کولین سویا به کلسترول حاصل شد. پتانسیل زتای اندازه‌گیری شده نانولیپوزوم برابر با ۵/۳- میلی‌ولت و میانگین اندازه نانولیپوزوم‌ها در دامنه ۱۱۹/۹-۹۴/۷ نانومتر با شاخص پراکندگی ۰/۲ تعیین شد که تأیید کننده یکنواختی توزیع اندازه ذرات و پایداری مطلوب آن‌ها در طول زمان است. همچنین تصاویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی نشانگر توزیع یکنواخت اندازه ذرات بود. رهایش تدریجی اسانس از درون نانولیپوزوم‌ها با زمان رابطه مستقیم داشت و پس از گذشت ۷۲ ساعت همچنان درصد بالایی از اسانس به صورت محصور شده در نانولیپوزوم‌ها باقی ماند. درون‌پوشانی لیپوزومی اسانس کاکوتی ویژگی‌های ضدمیکروبی آن‌را علیه دو باکتری بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* افزایش داد. همچنین بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی اسانس آزاد و نانولیپوزوم‌ها، نشان‌دهنده افزایش ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم‌ها در برابر اسانس آزاد است. نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده بهبود ویژگی‌های سلامت‌بخش آنتی‌اکسیدانی و عملکردی اسانس کاکوتی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمون است.

واژه‌های کلیدی: اسانس کاکوتی، درون‌پوشانی، فعالیت ضدمیکروبی، نانولیپوزوم، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

اسانس‌ها به عنوان متابولیت‌های ثانویه گیاهان معطر، ترکیباتی فرار، طبیعی، محلول در چربی و حلال‌های غیر قطبی با چگالی پایین‌تر از آب هستند و با مشخصه بو و آرومای قوی شناخته می‌شوند (Ortan *et al.*, 2009) و بسته به ترکیب شیمیایی آن‌ها، دارای ویژگی‌های فراسودمند هستند (Verma *et al.*, 2012). این ترکیبات نقش مهمی در حفاظت از گیاهان به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدحشره دارند (Bakkali *et al.*, 2008). ویژگی‌های بیولوژیکی متنوع اسانس‌ها از جمله ویژگی‌های ضدباکتریایی (Marino *et al.*, 2001)، آنتی‌اکسیدانی و گاها پیشگیری از رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی (Sherry *et al.*, 2013) گزارش شده است.

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی و استاد، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: akhondiafshin@gmail.com)
۳- کارشناس پژوهشی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

DOI: 10.22067/ifstrj.2021.72160.1085

گیاه کاکوتی (*Ziziphora tenuir*) متعلق به جنس *زیزیفورا*[1] و تیره نعناعیان[2] است (Entezary *et al.*, 2013). گیاهان تیره نعناع به طور معمول در درمان عفونت‌های دستگاه گوارش کاربرد داشته‌اند (Alavian *et al.*, 2020). اثرات ضدالتهابی گیاه کاکوتی ثابت شده است (Nabiuni *et al.*, 2015). گیاه کاکوتی شناخته شده در طب سنتی ایرانی شامل اندام‌های هوایی این گیاه بوده که حداقل حاوی ۱/۲ درصد (حجمی/وزنی) اسانس است (Azadmehr *et al.*, 2014). آلفا-ترپینول (۱۶/۲ درصد)، تیمول (۱۰/۴ درصد) و گرانیل استات (۵/۲ درصد) به ترتیب ترکیبات اصلی موجود در اسانس کاکوتی هستند که مقدار آن‌ها در اسانس وابسته به شرایط محیطی، کاشت، برداشت و پس از برداشت متغیر خواهد بود. اثرات ضدمیکروبی اسانس کاکوتی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثبات شده است (Mahboubi *et al.*, 2012).

اسانس‌ها ترکیبات ناپایدار از نظر بیولوژیکی، با انحلال‌پذیری پایین در آب (Coimbra *et al.*, 2011) و دارای توانایی پایین در رسیدن به نقاط هدف هستند. این گروه از ترکیبات گیاهی عمدتاً به نور، اکسیژن و دما حساس هستند (Martín *et al.*, 2010). بنابراین به منظور افزایش حلالیت و زیست دسترسی اسانس‌ها و همچنین حفاظت، کنترل رهایش و بهبود کارایی آن‌ها از تکنیک درون‌پوشانی استفاده می‌شود. برای این منظور ترکیبات مختلفی برای انکپسوله کردن اسانس‌ها به کار گرفته شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به بتا-سیکلودکسترین و هیدروکسیپروپیل بتا-سیکلودکسترین، مالتودکسترین (Fernandes *et al.*, 2008)، کنسانتره پروتئین آب پنیر (Rodea-González *et al.*, 2012)، کیتوزان (Avila-Sosa *et al.*, 2012)، نشاسته اصلاح شده (Krishnan *et al.*, 2005)، ژلاتین (Maji *et al.*, 2007) و صمغ عربی و ایزوله پروتئین سویا (Jun-xia *et al.*, 2011) و لیپوزوم‌ها (Varona *et al.*, Ortan *et al.*, 2009, 2011) اشاره کرد. لیپوزوم‌ها متشکل از یک هسته آبی و یک غشای دولایه با خواص آبدوستی و آبگریزی است. لیپوزوم‌ها زیست سازگار، زیست تخریب پذیر، غیر سمی و غیر تحریک کننده سیستم ایمنی بدن هستند (Voinea and Simionescu, 2002). درون‌پوشانی اسانس‌ها با لیپوزوم‌ها واکنش‌پذیری آن‌ها با محیط (تحت تأثیر عوامل آب، نور و اکسیژن) را کاهش می‌دهد، تبخیر شدن آن‌ها و نرخ انتقال یافتن آن‌ها به محیط پیرامون را کاهش داده، انتقال این ترکیبات را تسهیل می‌کنند، طعم آن‌ها را پوشانده و منجر به توزیع یکنواخت در محصول نهایی می‌شوند. بنابراین تکنیک درون‌پوشانی به منظور افزایش دادن انحلال‌پذیری و زیست‌دسترسی آن‌ها و محافظت از آن‌ها و همچنین رهایش کنترل شده آن‌ها و نهایتاً عملکرد و کارایی بیشتر آن‌ها معرفی شده است (Van Vuuren *et al.*, 2010).

اثرات ضدمیکروبی اسانس کاکوتی توسط سایر محققان گزارش شده است. خاصیت ضدباکتری اسانس کاکوتی کوهی روی میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی را تأیید کردند. بیشترین اثرگذاری اسانس روی *سالمونلا تیفیموریوم*[3] با حداقل غلظت مهارکنندگی برابر با ۲۲۵ میکروگرم در میلی لیتر مشاهده شد. اثر بازدارندگی آن در برابر مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس*[4] را گزارش شده است. همچنین تحقیقات انجام شده در زمینه استفاده از نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس‌های گیاهی نشان دهنده تاثیرات مثبت درون‌پوشانی بر ویژگی‌های ضدمیکروبی اسانس می‌باشد (Shafei *et al.*, 2012). پژوهش انجام شده در مورد تولید نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی و بررسی تأثیر آن روی باکتری *اشرشیاکلی O157:H7* نشان داد که حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشنده باکتریایی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس در برابر باکتری *اشرشیاکلی*، در مقایسه با اسانس آزاد کاهش پیدا کرد. نتایج این تحقیق اثبات کننده آن است که نانولیپوزوم‌ها می‌توانند اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها را افزایش دهند (Khatibi *et al.*, 2017).

پژوهش حاضر با هدف تهیه و بهینه‌سازی فرمولاسیون نانولیپوزوم حاوی اسانس کاکوتی و بررسی اثرات ضدمیکروبی این نانوحامل‌ها در برابر میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس ارئوس* و *اشرشیاکلی* به منظور استفاده به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی بالقوه در محصولات غذایی انجام شده است. همچنین رهایش اسانس در شرایط فیزیولوژیک به منظور بروز خواص درمانی اسانس در بدن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش از جمله کلسترول، متانول، توئین ۸۰، فسفاتیدیل کولین سویا، کلروفرم و نیز محیط‌های کشت میکروبی مورد استفاده از جمله نوترینت آگار، نوترینت براث از شرکت مرک (Merck) تهیه شد. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر از جمله *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* از مرکز سازمان پژوهش‌های صنعتی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه و شناسایی گیاه کاکوتی

بخش‌های هوایی گیاه کاکوتی (*Ziziphora tenuir*) از منطقه ارومیه در فصل بهار سال ۱۳۹۷ جمع آوری شده و سپس توسط گروه

1- *Ziziphora*
2- Labiatae *or* Lamiaceae
3- *Salmonella typhimurium*
4- *Kluyveromyces marxianus*

فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، شناسایی و نام علمی مورد تأیید قرار گرفت.

استخراج اسانس

بخش‌های هوایی گیاه کاکوتی (ساقه و برگ‌های جوان گیاه) در معرض نور غیر مستقیم خورشید (سایه) خشک شد و با استفاده از آسیاب پودر شده و از الک با مش ۲۰ عبور داده شد. به منظور اسانس گیری، ۱۰۰ گرم از پودر حاصله درون بالن تقطیر ریخته شد و با استفاده از آب مقطر و دستگاه کلونجر به روش تقطیر، اسانس‌گیری به مدت ۴ ساعت انجام شد. اسانس بدست آمده با استفاده از سدیم سولفیت بدون آب، خشک و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتیگراد درون ظروف شیشه‌ای رنگی در بسته نگهداری شد (Khatibi *et al.*, 2017).

تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی

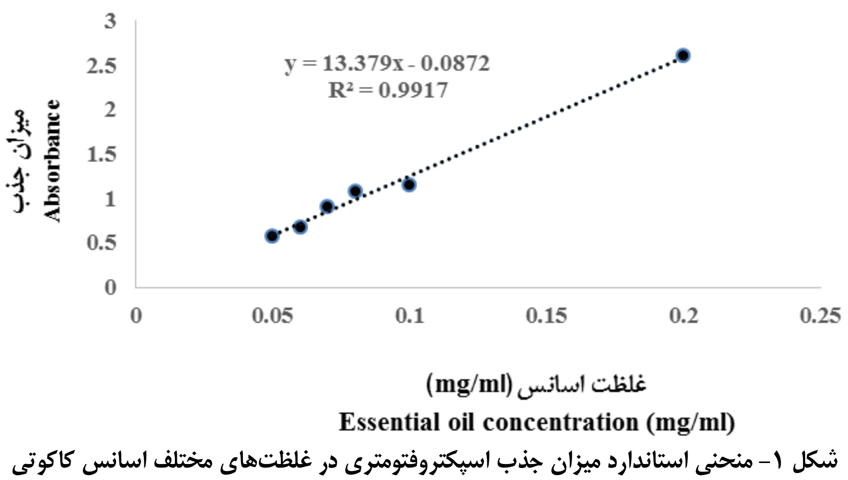
فسفاتیدیل کولین سویا و کلسترول (به نسبت‌های ۸۰:۲۰- ۷۵:۲۵ -۷۰:۳۰) به همراه اسانس کاکوتی در مقدار کافی از کلروفرم مخلوط و به درون بالن دستگاه تبخیر کننده دوار تحت خلاء (Heidolph، آلمان) منتقل شد. حلال آلی (کلروفرم) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تا رسیدن به فیلم نازک بر سطح جداره بالن تبخیر شد. هیدراته کردن فیلم لیپیدی با افزودن آب دیونیزه اضافه به مخلوط لیپیدی در دستگاه تبخیر کننده دوار با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور ۱۵۰ rpm تا رسیدن به محلول شیری رنگ انجام شد. کاهش اندازه لیپوزوم‌ها با استفاده از دستگاه سونیکاسیون (Materials & Sonics vibracell، انگلستان) با قدرت ۱۰۰ وات به مدت ۶ دقیقه با ترتیب ۲ ثانیه اعمال امواج فراصوت و ۲ ثانیه توقف امواج انجام شد و محلول از فیلتر با قطر حفرات ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. به منظور جداشدن اسانس درون‌پوشانی نشده در لیپوزوم‌ها، محلول پس از فیلتر شدن داخل کیسه دیالیز (Sigma، آمریکا) ریخته شده و در دمای ۳-۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه داخل آب دیونیزه همزنی شد (Varona *et al.*, 2011).

محاسبه راندمان درون‌پوشانی

محاسبه راندمان درون‌پوشانی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian، آمریکا) و با تهیه محلول‌های استاندارد از اسانس کاکوتی استخراج شده انجام شد. به این صورت که ۱۰۰ میکرولیتر محلول لیپوزومی حاوی اسانس کاکوتی با ۹۰۰ میکرولیتر متانول، رقیق شد و به مدت ۲ دقیقه ورتکس (vortex) می‌شود. درنتیجه با آزاد شدن اسانس‌ها از درون لیپوزوم‌ها، میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۷ نانومتر خوانده شد. با مطابقت میزان جذب اسپکتروفتومتر با منحنی استاندارد (شکل ۱) تهیه شده با غلظت‌های مشخص اسانس در حلال متانول، میزان اسانس آزاد شده از درون لیپوزوم‌ها تعیین می‌شود و از طریق معادله زیر درصد درون-پوشانی (راندمان درون‌پوشانی) تعیین می‌شود (Lu *et al.*, 2011).

$$EE\,(\%) = (C/C_0)\times 100 \qquad \text{(۱) معادله}$$

مقدار اسانس آزاد شده (C) و مقدار اسانس اولیه مصرف شده (C_0) می‌باشد.



شکل ۱- منحنی استاندارد میزان جذب اسپکتروفتومتری در غلظت‌های مختلف اسانس کاکوتی

Fig. 1- Standard curve of spectrophotometric absorption in different concentrations of Kakuti essential oil

ارزیابی انتشار اسانس از درون نانولیپوزوم‌ها

برای بررسی میزان رهایش اسانس از لیپوزوم، از روش انتشار از کیسه‌ی دیالیز استفاده شد. با توجه به کاربردهای درمانی گیاه کاکوتی و ترکیبات موجود در اسانس این گیاه، رهایش اسانس از حامل لیپوزومی در محیط in vivo مورد بررسی قرار گرفت و از محلول آبی فسفات بافر در pHهای مختلف برای این منظور استفاده شد (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۴ جهت بررسی رهایش برای سلول سالم و دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و pH=۵/۴ جهت بررسی رهایش برای سلول سرطانی). در این مرحله ۵۰ میلی لیتر از محلول فسفات بافر درون بشر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد و کیسه دیالیز (کاتاف[1] ۱۰ کیلودالتون) حاوی ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نانولیپوزومی درون آن قرار گرفت و با استیرر مگنتی با دور ۵۰۰ دور در دقیقه همزنی شد. سپس در فواصل زمانی مشخص ۱ میلی‌لیتر از بافر را برداشته و دوباره ۱ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر جایگزین شد. نمونه‌گیری به مدت ۷۲ ساعت و در فواصل زمانی ۱، ۲، ۶، ۸، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از بافر فسفات نمکی اطراف کیسه دیالیز برداشته و به همان مقدار (۱ میلی‌لیتر) بافر جدید با دما و pH یکسان اضافه گردید و سپس جذب نمونه‌های برداشت شده با استفاده از دستگاه اسپکترومتری و منحنی استاندارد اسانس در محلول فسفات بافر تعیین گردید (Gholamian Mohammadpanah *et al.*, 2020; *et al.*, 2020).

تعیین اندازه نانولیپوزوم‌ها و پتانسیل زتا[2]

اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها و پتانسیل زتا با روش پراش نور لیزر[3] و با استفاده از دستگاه زتاسایزر[4] (Malvern، انگلستان) تعیین شد. اساس کار این روش بر اساس حرکات براونی ذرات در محیط است. نمونه‌ها به نسبت ۱:۱۰۰ با استفاده از آب مقطر با تقطیر مجدد رقیق شد. سپس درون کوت[5]‌های استوانه‌ای عمودی (با قطر ۱۰mm) ریخته می‌شوند. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در زاویه پراش ثابت ۹۰ درجه و طول موج ۶۵۷ نانومتر انجام شد. هر نمونه با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت (Fang *et al.*, 2001).

تصویربرداری از نانولیپوزوم‌ها با میکروسکوب الکترونی

مورفولوژی سطح نمونه‌های تولید شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی (KYKY-EM3200، چین) با ماکزیمم ولتاژ ۲۶ کیلو ولت مورد بررسی قرار گرفت. آماده‌سازی نمونه با استفاده از آب مقطر صورت گرفته و نمونه مورد آزمون روی لامل تا خشک شدن کامل قرار داده شد. سپس نمونه مورد نظر با طلا پوشش دهی شده و تصویربرداری از نمونه با میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت گرفت. تصویر بدست آمده دارای بزرگنمایی ۲۰ هزار برابر بود (Haghiralsadat *et al.*, 2016).

تهیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمون

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این تحقیق شامل *استافیلوکوکوس ارئوس* (PTCC ۱۱۱۳) و *اشرشیاکلی* (PTCC ۱۳۹۹) بوده که به صورت پودر لیوفلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. باکتری‌ها روی محیط کشت نوترینت‌آگار[6] کشت داده و به‌مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید.

تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی با استفاده از یک حلقه کشت سترون، از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های رشد یافته روی محیط کشت نوترینت آگار، باکتری‌ها را به لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده و به خوبی مخلوط شد (عمل مخلوط کردن را می‌توان به مدت چند ثانیه بوسیله همزن لوله انجام داد). کدورت سوسپانسیون حاصل باید به میزانی باشد که جذب نوری آن در طول موج ۶۲۵ نانومتر ۰/۰۸ تا ۰/۱ شود (کدورت برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلند). این کدورت تقریباً معادل با ۱/۵×۱۰^۸ CFU[7]/ml است.

بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس

به منظور تعیین MIC (حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد) و MBC (حداقل غلظت کشنده) از روش رقت‌سازی درون لوله آزمایش استفاده شد. در حالت آزاد غلظت‌های متوالی اسانس روغنی کاکوتی در محیط کشت نوترینت براث حاوی ۰/۰۵ درصد محلول توئین ۸۰ در غلظت‌های (۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) تهیه شد. در حالت ریزپوشانی نیز سوسپانسیون‌های لیپوزومی در در غلظت‌های (۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از محیط کشت نوترینت براث تهیه می‌شوند. به هریک از رقت‌های تهیه شده از اسانس کاکوتی در دوحالت آزاد و ریزپوشانی، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده پس از رقت‌سازی با محیط کشت نوترینت براث تا رسیدن به

1- Cut-off
2- Zeta potential
3- Dynamic Light Scattering (DLS)
4- Zetasizer
5- Cuvette
6- Nutrient agar
7- Colony forming unit

غلظت نهایی cfu/ml ۱۰^۶×۱–۰/۵، به محیط حاوی اسانس آزاد و یا درون‌پوشانی شده اضافه شد و در نتیجه با اضافه شدن سوسپانسیون باکتری غلظت اسانس آزاد و درون‌پوشانی شده نصف خواهد شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شده و از نظر وجود یا عدم وجود کدورت در لوله‌ها بررسی شد. غلظت اسانس موجود در اولین لوله‌ای که کدورتی در آن مشاهده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC، از رقت‌هایی که در آن‌ها کدورت مشخصی ایجاد نشده باشد به میزان ۰/۱ میلی- لیتر با روش پخش یکنواخت در محیط نوترینت آگار کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، اولین غلظتی که عدم رشد باکتری در آن مشهود بود به عنوان MBC گزارش می‌شود (Gharenaghadeh *et al.*, 2017).

آزمون تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش خنثی سازی رادیکال‌های آزاد DPPH [1]

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس قبل و بعد از درون‌پوشانی اندازه- گیری شد. ابتدا ۱ میلی لیتر از محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH در متانول به ۱ میلی لیتر اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس در رقت‌های مختلف (۰/۰۸، ۰/۲، ۰/۵، ۰/۷، ۱) تهیه شده با استفاده از حلال متانول افزوده شد. میزان جذب نوری نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر در مقابل نمونه شاهد، اندازه‌گیری و ثبت شد.

معادله (۲) $\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (Ac-As)/Ac\times100$

که در این رابطه A_s و A_c به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشد (Gholamian *et al.*, 2020).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و با استفاده از روش تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) و با به کارگیری نرم افزار SPSS 24 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد.

نتایج و بحث

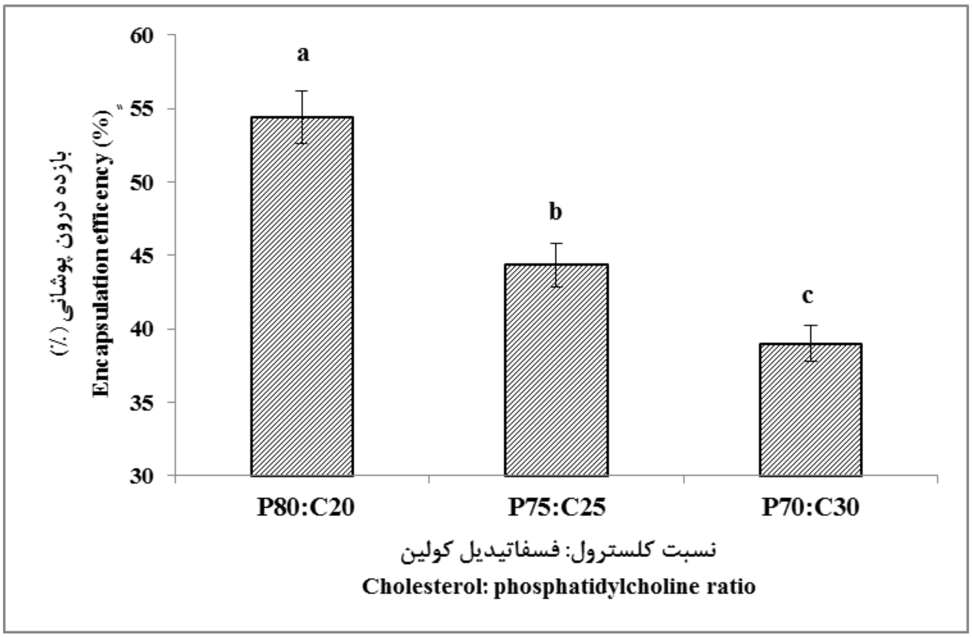
راندمان درون‌پوشانی

شکل ۲ نشان دهنده راندمان درون‌پوشانی اسانس با نسبت‌های مختلف فسفاتیدیل کولین سویا به کلسترول در ساختار نانولیپوزوم‌ها است. نتایج نشان دهنده تفاوت معنادار (P<۰/۰۵) این شاخص با توجه به متغیر نسبت وزنی این دو ترکیب در دیواره لیپوزوم هاست. بالاترین راندمان درون‌پوشانی مربوط به نسبت فسفاتیدیل کولین سویا ۸۰ : ۲۰ کلسترول (۵۴/۴۱±۱/۸۲ درصد) بود. در سابقه مطالعات مشابه راندمان درون پوشانی برای اسانس گیاهان زنیان و نعناع فلفلی به ترتیب برابر با ۳۵/۶±۷/۴ درصد و ۶۱/۳۸±۲/۷ درصد گزارش شده است (Majdizadeh *et al.*, Haghiralsadat *et al.*, 2016; 2020). روند کلی نشان دهنده روند افزایشی این پارامتر با افزایش سهم فسفاتیدیل کولین سویا و کاهش کلسترول در ساختار لیپوزوم هاست. کلسترول به منظور بهبود سیالیت و پایداری در ساختار لیپوزوم‌ها استفاده می‌شود و مقدار آن می‌تواند در ویژگی لیپوزوم‌ها و راندمان درون‌پوشانی تأثیرگذار باشد (Jaafar-Maalej *et al.*, 2010). در واقع اسانس‌های روغنی با کلسترول در محصور شدن درون فضای چربی‌دوست در غشای لیپوزومی رقابت می‌کنند (Fang *et al.*, 2001). کلسترول انعطاف پذیری غشای لیپوزومی را کاهش داده و در نتیجه امکان تشکیل یکپارچه غشاء اطراف اسانس را کاهش می‌دهد (Mohammed *et al.*, 2004). افزایش کلسترول منجر به فشرده کردن ساختمان لیپوزوم و کاهش کارایی درون‌پوشانی می‌شود (Gharenaghadeh *et al.*, 2017). بر مبنای این رفتار می‌توان نتیجه گرفت که افزایش کلسترول در ترکیب لیپوزوم منجر به کاهش راندمان درون‌پوشانی شده و این نتیجه منطبق بر نتایج پژوهش اورتان و همکاران (Ortan *et al.*, 2009) و همچنین قنبرزاده و همکاران (Gharenaghadeh *et al.*, 2017) می‌باشد.

تعیین اندازه نانولیپوزوم‌ها و پتانسیل زتا

اندازه ذرات عاملی برجسته است که دارای ارتباط مستقیم با پایداری نانولیپوزوم‌ها و رهاسازی ترکیبات فعال، کارایی به دام اندازی و کاربردهای واقعی نانوذرات می‌باشد (Najafi and Mohammadi Sani, 2020). جدول ۲ نشان دهنده میانگین قطر حجمی و شاخص پراکندگی ذرات می‌باشد. با توجه به داده‌های بدست آمده می‌توان مشاهده کرد که با افزایش سهم کلسترول در ساختار دیواره نانولیپوزوم‌ها میانگین قطر حجمی آن‌ها کاهش یافته است ولی تفاوت معنادار (P<۰/۰۵) در شاخص پراکندگی و میانگین قطر حجمی ذرات ایجاد نکرد. گزارش‌های متفاوتی در مورد اثر کلسترول بر اندازهٔ ذرات لیپوزومی منتشر شده است. در پژوهش انجام شده به منظور بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی گاما اوریزانول، مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر، مشاهده شد که افزودن میزان کلسترول در ترکیب دیواره نانولیپوزوم‌ها سبب کاهش اندازه ذرات از ۷۲ به ۶۳ نانومتر شد (Viriyaroj *et al.*, 2009).

1- 1-2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl



شکل ۲- نمودار بازده درون‌پوشانی با توجه به نسبت‌های مختلف وزنی فسفاتیدیل کولین و کلسترول

Fig. 2- Diagram of the efficiency of the coating according to different weight ratios of phosphatidylcholine and cholesterol

* حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) میانگین داده‌ها است.

همچنین محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2014) در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D_3 به این نتیجه رسیدندکه افزایش غلظت کلسترول تأثیر معناداری روی اندازه و توزیع اندازه ذرات نداشت. در غشاهای لیپوزومی که غنی از فسفاتیدیل کولین هستند، به دلیل حضور گروه‌های قطبی بزرگ در سر فسفولیپید، فضاهای خالی در ساختار ایجاد می‌شود که در این شرایط گروهای آسیل که در دم قرار دارند، طوری جهت گیری می‌کنند که هم فضاهای خالی ایجاد شده را کمتر کنند و هم بیشترین تماس را با هم داشته باشند. حضور کلسترول، ساختار قرار گیری لیپید و جهت گیری زنجیره‌های آسیل در دو لایهٔ لیپیدی را تغییر می‌دهد. به این صورت که گروه‌های هیدروکسیل کلسترول با ایجاد پیوند هیدروژنی با گروه‌های کربونیل استری، زنجیره‌های آسیلی که به یک سمت کج شده‌اند را به صورت مستقیم و مرتب نگه می‌دارد و فضاهای ایجاد شده بین آنها را پر می‌کند. قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود (Mohammadi *et al.*, 2014). به‌طور کلی می‌توان گفت که کلسترول بیشتر بر پایداری فیزیکی (پایداری اندازه ذرات) در طول زمان مؤثر است و تأثیر اندکی براندازهٔ ذرات هنگام تشکیل لیپوزوم دارد (Ghanbarzadeh *et al.*, 2016).

اندازه لیپوزوم‌های تهیه شده در پژوهش حاضر در دامنه ۱۱۹/۹-۹۴/۷ نامتر قرار دارد. حقیرالسادات و همکاران (Haghiralsadat *et al.*, 2016) میانگین اندازه لیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان که با روش و ترکیبات لیپیدی دیواره مورد استفاده در پژوهش حاضر تهیه شدند را ۱۸۶/۱ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۲۴۷ گزارش کردند. همچنین مجدیزاده و همکاران (Majdizadeh *et al.*, 2020) با روش و ترکیبات مشترک نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس نعناع فلفلی با اندازه ذرات ۱۳±۲۴۷ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۰۱±۰/۳۲ تهیه کردند. در پژوهش دیگر، نانولیپوزوم‌های اسانس اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) تهیه شد، اندازه نانولیپوزوم‌ها را در دامنه ۲۹۸-۴۰/۵ نانومتر گزارش کردند که این تفاوت در اندازه به تفاوت در فرمولاسیون ساختار دیواره لیپوزوم‌ها نسبت داده شده است (Moghimipour *et al.*, 2012). در مطالعه دیگری که توسط oxdfd و همکاران انجام شد، اندازه لیپوزوم‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) که با سه روش سونیکاسیون، تبخیر فیلم لایه نازک به همراه سونیکاسیون و تزریق اتانول تهیه شدند به ترتیب برابر با ۰/۴±۹۹/۹، ۲۶/۶±۳۹۵/۳ و ۲۵/۲±۲۳۹/۷ نانومتر گزارش شد (Khatibi *et al.*, 2014). تفاوت در اندازه لیپوزوم‌های تهیه شده در پژهش حاضر با سایر مطالعات مشابه را می‌توان به تفاوت‌ها در ترکیب غشای وزیکول لیپیدی، به ویژه نوع فسفولیپیدها، میزان کلسترول، روش آماده سازی و نوع اسانس نسبت داد (Moghimipour *et al.*, 2012).

سیستم نانولیپوزومی تهیه شده در این مطالعه، پراکندگی اندازه ذرات مطلوبی (شاخص پراکندگی پایین) را برای لیپوزوم‌ها نشان داد (جدول ۲). با توجه به تفاوت سهم ترکیبات تشکیل دهنده ساختار نانولیپوزوم‌های مورد آزمون، تفاوت معناداری (P<۰/۰۵) در شاخص پراکندگی اندازه ذرات مشاهده نشد. کوچک بودن این شاخص، بیانگر توزیع ذره‌ای باریک‌تر است، بنابراین قطر ذرات یکنواخت‌تر می‌باشد. مقدار بیش از ۰/۳ برای این شاخص نشان‌دهنده ناهمگن بودن توزیع اندازه ذرات است. روش تولید مورد استفاده (هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت) در تهیه نانولیپوزوم‌ها مستقل از غلظتهای متفاوت فسفاتیدیل کولین سویا-کلسترول، برای تولید لیپوزوم‌های پایدار در مقیاس نانو و توزیع اندازه ذرات یکنواخت مناسب است (Najafi *et al.*, 2019).

جدول ۲- میانگین قطر حجمی و شاخص پراکندگی توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی

Table 2- Average volume diameter and dispersion index of particle size distribution of nanoliposomes containing kakuti essential oil

تیمار Treatment	شاخص پراکندگی Dispersion index	میانگین قطر حجمی Volumetric average diameter (nm)	غلظت فسفاتیدیل کولین-کلسترول Phosphatidylcholine-cholesterol concentration
1	0.27± 0.020 [a]	119.9±25.7 [a]	20-80
2	0.28± 0.015 [a]	105.1±21.8 [a]	25-75
3	0.26± 0.015 [a]	94.7±16.7 [a]	30-70

* اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) بین میانگین داده‌ها در هر پارامتر مورد آزمون وجود ندارد.

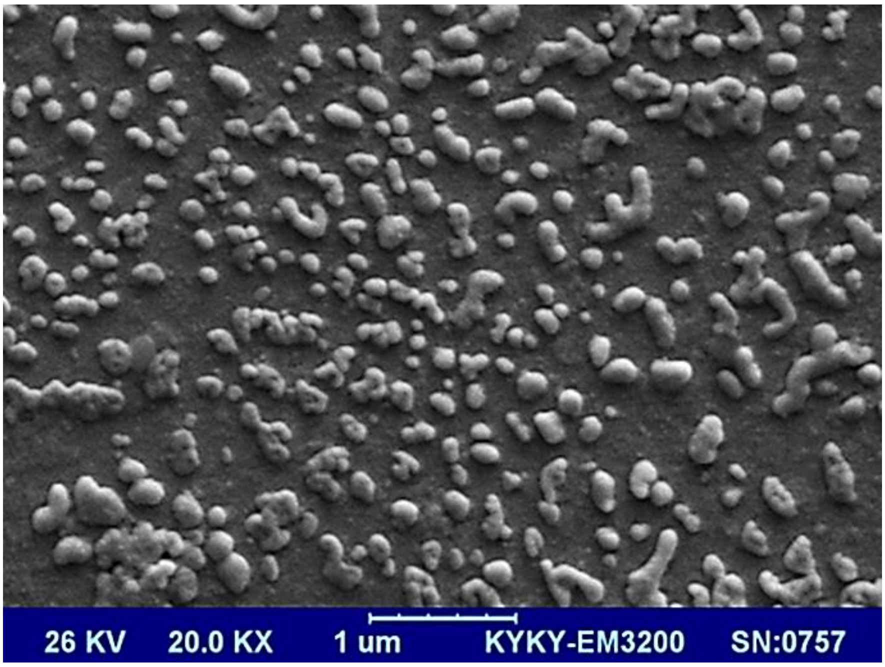
پتانسیل زتا به عنوان شاخصی از بار سطحی نانو ذرات یکی از فاکتورهای مهم در پایداری نانو ذرات بوده و هرچه مقدار آن بیشتر باشد، بار سطحی نانو ذرات بیشتر و در نتیجه دافعه الکترواستاتیک بالاتر و میزان به هم چسبیدگی ذرات کمتر خواهد بود (Sherry *et al.*, 2013). پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های دارای بالاترین راندمان درون‌پوشانی برابر با ۵/۳- میلی ولت بود. بار منفی لیپوزوم‌ها را می-توان به ساختار فسفولیپیدی آن‌ها نسبت داد که به صورت عادی دارای بار منفی هستند (Gholamian *et al.*, 2020) که این ممکن است به دلیل حضور فسفاتیدیل کولین و موقعیت قرارگیری اسیدچرب آن و یونیزاسیون گروههای فسفات و کربوکسیل باشد (Ghanbarzadeh *et al.*, 2016). بررسی پتانسیل زتای نانولیپوزوم های حاوی اسانس‌های گیاهی در سابقه مطالعات حاکی از دامنه گسترده‌ای از مقادیر برای این پارامتر مورد مطالعه می‌باشد. بررسی سابقه مطالعات نشان می‌دهد که نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس گیاهان زنیان و نعناع فلفلی که با استفاده از روش و ترکیبات مورد استفاده در پژوهش حاضر تهیه شدند، به ترتیب دارای پتانسیل زتای ۶/۷- تا ۱- و ۰/۷۴±۳۴/۵۴- میلی ولت بودند (Majdizadeh *et al.*, 2018, Haghiralsadat *et al.*, 2016). نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس پونه (*M. pulegium*) و باریجه (*F. gummosa*) که با روش حرارتی (مظفری) تهیه شدند، به ترتیب دارای پتانسیل زتای برابر با ۱/۳۴±۱۷/۲- و ۱/۲۰±۱۴/۰۵- بودند (Faraji *et al.*, 2020). زبیحی و همکاران (۲۰۱۷) مقدار این پارامتر را برای نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس سیر (*A. sativum*) برابر با ۰/۸۷±۲۳/۲۰- گزارش کردند. تفاوت در مقادیر مربوط به این شاخص را می‌توان به دلیل تفاوت‌های موجود در روش‌های تولید، ترکیبات تشکیل دهنده لیپوزوم‌ها و نوع اسانس نسبت داد. براساس گزارشات، مقدار بین ۳۰- میلی ولت و ۳۰+ میلی ولت به عنوان پتانسیل زتای بالا و قابل قبول در نظر گرفته می‌شود (Zabihi *et al.*, 2017).

بررسی مورفولوژی نانولیپوزوم‌ها

ارزیابی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که مرز ذرات از یکدیگر قابل تفکیک است و چسبیدگی ذرات به یکدیگر مشهود نیست. کروی بودن نسبی نانو ذرات لیپیدی جامد باعث می شود که این ذرات بیشترین توانایی را جهت آزادسازی کنترل شده و محافظت از اسانس احتباس یافته داشته باشند زیرا شکل کروی دارای طولانی ترین مسیر جهت حرکت اسانس محبوس در نانو ذره و همچنین کمترین سطح تماس با محیط آبی فاز پراکنده، نسبت به سایر اشکال نانوذرات می‌باشد (Nasseri *et al.*, 2016).

رهایش اسانس از درون نانولیپوزوم

برای سنجش پایداری نانوحامل‌ها از روش‌هایی از جمله اندازه گیری اندازه ذرات بعد از گذشت زمان، اندازه‌گیری پتانسیل زتا و یا اندازه‌گیری میزان رهایش نانوحامل در طول زمان می‌توان استفاده کرد (Gharenaghadeh *et al.*, 2017). رهایش اسانس در فاصله زمانی ۱ تا ۷۲ ساعت در شکل ۴ گزارش شده است. با توجه به داده های بدست آمده می‌توان گفت که به طور کلی درصد رهایش اسانس در محلول بافر فسفات نمکی ۷/۴ نسبت به محلول بافر فسفات نمکی ۵/۴ بالاتر بوده و این اختلاف در درصد رهایش از زمان ماندگاری پس از ۳۰ ساعت شیب بیشتری پیدا کرد.



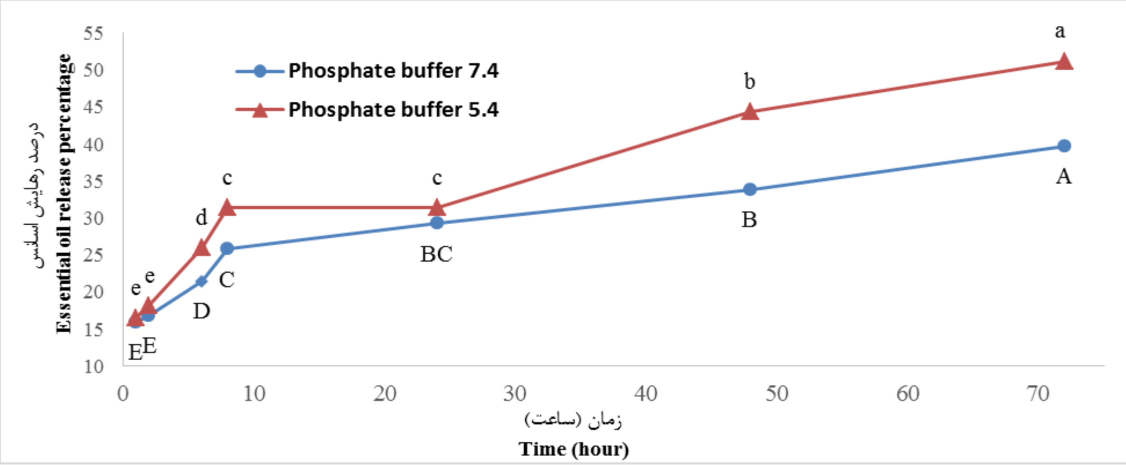
شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی

Fig. 3- Scanning electron microscope (SEM) image of nanoliposomes containing kakuti essential oil

شکل ۳ نشان می‌دهد که رهایش اسانس در طول دوره زمانی با شیب نسبتاً ملایم اتفاق افتاده است و پس از گذشت بازه زمانی مورد مطالعه همچنان درصدهای نسبتاً بالایی از اسانس درون نانولیپوزوم به صورت محصور شده باقی مانده است. می‌توان نتیجه گرفت که رهایش اسانس در طول زمان در شرایط فیزیولوژیک به صورت کنترل شده و به صورت رهایش تدریجی است که این مهم در بروز اثرات مدت‌دار اسانس در بروز خواص درمانی و تاثیرات ضدمیکروبی آن در برابر میکروارگانیسم‌ها اهمیت دارد. نتایج بدست آمده در خصوص رهایش تدریجی اسانس منطبق با یافته‌های حقیرالسادات و همکاران است. در پژوهش ایشان که از ترکیبات و روش مشابه با پژوهش حاضر برای تولید لیپوزوم‌ها بهره گرفته شده است، نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان دارای رهایش تدریجی در محیط آبی بودند. ایشان گزارش کردند که نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان در شرایط فیزیولوژیک رهایش کنترل شده دارند و به عبارت دیگر چنانچه نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان در شرایط فیزیولوژیک به کار گرفته شود، اسانس به تدریج از وزیکول آزاد شده و تأثیر درمانی خود را اعمال می‌سازد (Haghiralsadat *et al.*, 2016). یافته‌های مشابه توسط مجدیزاده و همکاران در مورد لیپوزوم‌های حاوی اسانس نعناع فلفی گزارش شده است (Majdizadeh *et al.*, 2020).

ویژگی‌های ضدمیکروبی اسانس آزاد و نانولیپوزوم حاوی اسانس

جدول ۱ نشان دهنده غلظت‌های کشنده و مهار کننده اسانس آزاد و نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی در برابر باکتری‌های مورد آزمون است. با توجه به داده‌های بدست آمده مشاهده می‌شود که باکتری *اشرشیاکلی* (به عنوان شاخصی از باکتری‌های گرم منفی) نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (به عنوان شاخصی از باکتری‌های گرم مثبت) دارای حساسیت پایین‌تری نسبت به اسانس آزاد و درون‌پوشانی شده کاکوتی است. به دلیل تفاوت ساختاری دیواره باکتری‌ها، عمدتاً باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بالاتری نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی دارند. بیان شده است که مقاومت باکتریهای گرم منفی در برابر اسانس ها می تواند به دلیل وجود غشای خارجی آب دوست آنها باشد که از نفوذ اسانس های آبگریز به غشای سلولی و داخل سلول جلوگیری می کند (Hazrati *et al.*, 2020). اثرات ضدمیکروبی گیاهان تیره *Ziziphora* بر علیه باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* ثابت شده است (Sonboli *et al.*, 2006).



شکل ٤- رهایش اسانس محصور شده در نانولیپوزوم‌ها

Fig. 4- Release of essential oil encapsulated in nanoliposomes

* حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) میانگین داده‌ها در غلظت‌های مختلف اسانس آزاد یا نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس است.

ترکیبات عمده موجود در اسانس‌های روغنی فنل‌ها و ترپن‌ها هستند، در نتیجه می‌توان گفت که مکانیسم اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها مشابه اثرات ترکیبات فنلی و ترپن‌هاست. در واقع ترکیبات فنلی علاوه بر صدمه به غشای سلولی، در زنجیره انتقال الکترون، سنتز پروتئین و اسید نوکلوئیک اختلالاتی ایجاد می‌کنند. ترکیب عمده موجود در اسانس کاکوتی، پولگون می‌باشد. این ترکیب یک کتون و جزء گروه مونوترپن‌هاست. ترپن‌ها قادرند به غشای سلولی صدمه زده و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری‌ها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول‌ها می‌شود (Alizadeh *et al.*, 2014). میزان پولگون در گونه‌های گیاهی مختلف و تحت تأثیر سایر عوامل از جمله منطقه رشد گیاه، شرایط آب و هوایی، فصل برداشت و شرایط آزمایشگاهی استخراج اسانس متفاوت بوده و در نتیجه با متغیر بودن ترکیبات مؤثره در این گیاهان فعالیت بیولوژیکی متفاوتی نسبت به یکدیگر نشان خواهند داد (Zhang *et al.*, 2018). سزیک و همکاران مقدار پولگون در اسانس *Z. tenuior* را برابر با ۸۷/۱ درصد گزارش کرده است (Sezik *et al.*, 1991) و این درحالی است که محبوبی و همکاران در لیست ترکیبات اسانس استخراج شده از این همین گونه گیاهی پولگون را عنوان نکرده و α-Terpineole را به عنوان ترکیب اصلی موجود در این اسانس گزارش کرده‌اند (Mahboubi *et al.*, 2012).

حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نانولیپوزوم در مقایسه با اسانس آزاد در هر دو نوع باکتری گرم منفی و گرم مثبت پایین‌تر است که می‌تواند به دلیل وجود حفراتی در سطح غشای باکتری‌هایی است که محل ورود و خروج مواد می‌باشد، هرچه نانوذرات تولیدی کوچکتر باشد راحتتر می‌توانند به این حفرات وارد شده و ماده زیست فعال خود را آزاد سازند. علاوه بر این، به دلیل اینکه جنس نانولیپوزوم از فسفولیپید می‌باشد، سیالیت غشایی بیشتری داشته در نتیجه در این حالت اسانس راحت‌تر می‌تواند از غشای باکتریایی به داخل سلول نفوذ کند و سبب تخریب دیواره سلولی شود (Gharenaghadeh *et al.*, 2017). نودوست و همکاران نتیجه گرفتند که عصاره چای سبز پس از درون‌پوشانی لیپوزومی در مقایسه با عصاره آزاد خاصیت ضدمیکروبی بالاتری را نشان داد (Noudoost *et al.*, 2015). مقیمی پور و همکاران گزارش کردند که درون‌پوشانی اسانس برگ اکالیپتوس منجر به افزایش ویژگی‌های ضدقارچی آن می‌شود (Moghimipour *et al.*, 2012). لیولیوس و همکاران توضیح دادند که استفاده از نانولیپوزوم‌ها از طریق برهمکنش با سلول‌های باکتریایی از طریق راه‌های مختلف از جمله انتقال بین غشایی، آزادی تماس، جذب و فاگوسیتوز، انتقال سلولی و آزادسازی ترکیبات فعال در داخل سلول‌های باکتریایی بهبود می‌بخشند لذا سبب افزایش خاصیت ضدمیکروبی می‌شوند (Liolios *et al.*, 2009).

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش خنثی‌سازی رادیکال های آزاد DPPH

در این پژوهش به منظور بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی اسانس آزاد و درون‌پوشانی شده کاکوتی از روش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و محاسبه درصد مهارکنندگی آن استفاده شد. با توجه به داده‌های گزارش شده در جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که غلظت اسانس یا نانولیپوزوم حاوی اسانس در درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH تأثیر معنادار دارد (P<۰/۰۵). با افزایش غلظت، درصد مهارکنندگی

رادیکال آزاد DPPH افزایش یافته و در بین غلظت‌های ۰/۷ و ۱ (میلی گرم بر میلی‌لیتر) از اسانس آزاد و نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس، تفاوت معناداری مشاهده نشده ولی دارای اختلاف معنادار نسبت به سایر غلظت‌های مورد آزمون هستند (P<۰/۰۵). نتایج حاکی از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتر نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس نسبت به اسانس آزاد است. این یافته منطبق با نتایج نودوست و همکاران در خصوص بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و درون‌پوشانی شده با لیپوزوم‌هاست که این امر به دلیل پراکندگی بالاتر نانولیپوزوم‌ها نسبت به اسانس آزاد در محیط است (Noudoost *et al.*, 2015). مایتی و همکاران نیز خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر کمپلکس کورکومین–فسفولیپید را نسبت به کورکومین آزاد گزارش کردند (Maiti *et al.*, 2005).

جدول ۱- MIC و MBC اسانس آزاد و نانولیپوزوم حاوی اسانس در برابر دو باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

Table 1- MIC and MBC of free essential oil and nanoliposome containing essential oil against two bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

نام ماده/باکتری *Microorganism* *Antibacterial agent/*	استافیلوکوکوس اورئوس *Staphylococcus aureus* MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)	اشرشیاکلی *Escherichia coli* MBC (µl/ml)	MIC (µl/ml)
Free essential oil اسانس آزاد	125	75	175	100
Nanoliposome containing essential oil نانولیپوزوم حاوی اسانس	100	50	150	75

جدول ۲- درصد مهار رادیکال آزاد DPPH غلظت‌های مختلف اسانس آزاد و نانولیپوزوم

Table 2- DPPH free radical inhibition percentage of different concentrations of free essential oil and nanoliposome

	غلظت‌های مختلف اسانس آزاد و نانولیپوزوم (میلی گرم بر میلی لیتر) Different concentrations of free essential oil and nanoliposome (mg/ml) 1	0.7	0.5	0.2	0.08
اسانس آزاد Free essential oil	44.74±7.05 [a]	39.49±12.55 [a]	24.59±5.82 [b]	22.76±7.43 [b]	20.72±2.74 [b]
نانولیپوزوم حاوی اسانس Nanoliposomes containing essential oil	48.77±6.68 [a]	42.93±10.75[a]	26.88±3.82 [b]	24.40±5.41 [b]	22.32±2.20 [b]

* حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) میانگین داده‌ها در غلظت‌های مختلف اسانس آزاد یا نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس است.

نتیجه‌گیری

راندمان درون‌پوشانی به عنوان شاخصی برای تعیین موفقیت فرایند درون‌پوشانی معرفی می‌شود. بالاترین راندمان درون‌پوشانی مربوط به نسبت فسفاتیدیل کولین سویا ۸۰ : ۲۰ کلسترول (۵۴/۴۱±۱/۸۲) بوده و روند کلی نشان‌دهنده روند افزایشی این پارامتر با افزایش سهم فسفاتیدیل کولین و کاهش کلسترول در ساختار لیپوزوم‌هاست. نانولیپوزوم‌ها با اندازه کوچکتر دارای پایداری بیشتری هستند. میانگین اندازه نانولیپوزوم‌های تولید شده در این تحقیق در دامنه ۹۴/۷–۱۱۹/۹ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۲ تعیین شده که تأیید کننده یکنواختی توزیع اندازه ذرات و پایداری مطلوب آن‌ها در طول زمان است. همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی تاییدی بر یکنواختی توزیع اندازه ذرات است. بررسی الگوی رهایش اسانس از درون نانولیپوزوم‌ها نشان دهنده رهایش تدریجی اسانس بوده و بالاترین میزان رهایش مربوط به زمان ۷۲ ساعت در بافر فسفات نمکی ۵/۴ می‌باشد. باکتری *اشرشیاکلی* (به عنوان شاخصی از باکتری‌های گرم منفی) نسبت به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (به عنوان شاخصی از باکتری‌های گرم مثبت) دارای حساسیت پایین‌تری نسبت به اسانس آزاد و درون‌پوشانی شده کاکوتی هستند. همچنین یافته‌ها حاکی از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتر نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس نسبت به اسانس آزاد است.

منابع

1. Alavian, S.M., Ghorbani, A., & Roshani, M. (2020). Analgesic effect of *Ziziphora tenuior* essential oil and lubricant gel in patients referring for colonoscopy: A randomized double-blind clinical trial. *Govaresh*, *25*(1), 51-55.

2. Alizadeh, B.B., Tabatabaei, Y.F., Shahidi, F., Mohebbi, M., & Zanganeh, H. (2014). Investigation of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on Gram positive and Gram negative bacteria "in Vitro." *Sadra Medical Sciences Journal*, 2(2), 123-134.
3. Avila-Sosa, R., Palou, E., Munguía, M.T.J., Nevárez-Moorillón, G.V., Cruz, A.R.N., & López-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(1), 66-72. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.017
4. Azadmehr, A., Mosalla, S., Hajiaghaee, R., & Shahnazi, M. (2014). Immunomodulatory effects of Ziziphora tenuior L. extract on the dendritic cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, *22*(1), 1-6. https://doi.org/10.1186/s40199-014-0063-8
5. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils–a review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446-475. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106
6. Coimbra, M., Isacchi, B., Van Bloois, L., Torano, J. S., Ket, A., Wu, X., Broere, F., Metselaar, J.M., Rijcken, C.J., & Storm, G. (2011). Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, *416*(2), 433-442. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.056
7. Entezary, A., Neamatshahi, M., Khodaparast, M., Farjam, M., Nematshahi, N., & Mohammadi, M. (2013). The effects of adding extracts of Ziziphora (*Ziziphora tenuir*) as flavoring to chewing gums and the study of the release of caffeine from these extracts. *Eur. Journal Exp. Biology*, *3*(5), 307-312. https://doi.org/10.3390/molecules21070826
8. Fang, J.-Y., Hong, C.-T., Chiu, W.-T., & Wang, Y.Y. (2001). Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, *219*(1-2), 61-72. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00627-5
9. Faraji, Z., Shakarami, J., Varshosaz, J., & Jafari, S. (2020). Encapsulation of essential oils of *Mentha pulegium* and *Ferula gummosa* using nanoliposome technology as a safe botanical pesticide. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *7*(4), 237-242. https://doi.org/10.30491/JABR.2020.121704
10. Fernandes, L.P., Turatti, I.C., Lopes, N.P., Ferreira, J.C ,.Candido, R.C., & Oliveira, W.P. (2008). Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil. *Drying Technology*, *26*(12), 1534-1542. https://doi.org/10.1080/07373930802464034
11. Ghanbarzadeh, B., Pezeshki, A., Hamishekar, H. and Moghaddam, M., (2017). Vitamin A palimitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. *Iranian Journal Food Science and Technology Research*, *12*(2), 261-275. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i2.38396
12. Gholamian, R., Nikoonahad Lotfabadi, N., & Haghiralssadat, B.F. (2020). Evaluation of antioxidant and cytotoxic effects of liposomes containing pineapple fruit extract on Melanoma skin cancer (A375 Cell Line). *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, *28*(2), 2411-2424. https://doi.org/10.18502/ssu.v28i2.3480
13. Haghiralsadat, F., Azhdari, M., Kalantar, S.M., Naderinezhad, S., Teymourizadeh, K., Yazdani, M., Hashemi, M., & Daneshmand, F. (2016). Strategy of Improvements in the rapeutic index of medicinal herbs of Iranianin digenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in corporated *Trachyspermum copticum*. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, *24*(6), 468-478.
14. Hazrati, S., Govahi, M., Sedaghat, M., & Kashkooli, A.B. (2020). A comparative study of essential oil profile, antibacterial and antioxidant activities of two cultivated Ziziphora species (*Z. clinopodioides* and *Z. tenuior*). *Industrial Crops and Products*, *157*, 112942-112949. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112942
15. Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A. & Fessi, H. (2010). Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of liposome research* 20(3): 228-243. https://doi.org/10.3109/08982100903347923
16. Jun-Xia, X., Hai-Yan, Y., & Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, *125*(4), 1267-1272. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.063
17. Khatibi, S.A., Misaghi, A., Moosavy, M.H., Amoabediny, G., & Basti, A.A., (2014). Effect of preparation methods on the properties of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil loaded nanoliposomes: characterization of size, encapsulation efficiency and stability. *Pharmaceutical Sciences*, *20*(4), 141-148.
18. Khatibi, S.A., Misaghi, A ,.Moosavy, M.H., Basti, A.A., Koohi, M.K., Khosravi, P., & Haghirosadat, F. (2017). Encapsulation of *Zataria multiflora* Bioss. essential oil into nanoliposomes and in vitro antibacterial activity against *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*(3), 1-10. https://doi.org/10.1111/jfpp.12955

19. Krishnan, S., Kshirsagar, A.C., & Singhal, R.S. (2005). The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers, 62*(4), 309-315. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.020
20. Liolios, C., Gortzi, O., Lalas, S ,.Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry, 112*(1), 77-83. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060
21. Lu, S., Xing, J., Zhang, Z., & Jia, G. (2011). Preparation and characterization of polyurea/polyurethane double-shell microcapsules containing butyl stearate through interfacial polymerization. *Journal of Applied Polymer Science, 121*(6), 3377-3383. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.02.007
22. Mahboubi, M., Kazempour, N., & Hosseini, H. (2012). Chemical composition, antimicrobial activity of essential oil from *Ziziphora tenuir* L. aerial parts. *Journal of Essential Oil Bearing Plants, 15*(4), 545-549. https://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644086
23. Maji, T., Baruah, I., Dube, S., & Hussain, M. (2007). Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology, 98*(4), 840-844. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.005
24. Majdizadeh, M., Rezaei Zarchi, S., Movahedpour, A.A., Shahi Malmir, H., Sasani, E., & Haghiralsadat, B.F. (2018). A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing *Mentha piperita* essential oil. *SSU_Journals, 25*(11), 853-864.
25. Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Ahamed, H.N., Saha, B.P., & Mukherjee, P.K. (2005). Enhanced therapeutic benefit of quercetinphospholipid complex in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats: a comparative study. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics, 4*(2), 84-90.
26. Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology, 67*(3), 187-195. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00447-0
27. Martín, Á., Varona, S., Navarrete, A., & Cocero, M. J. (2010). Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *The Open Chemical Engineering Journal, 4*(1), 31-41. https://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2008.08.015
28. Moghimipour, E., Aghel, N., Mahmoudabadi, A.Z., Ramezani, Z., & Handali, S. (2012). Preparation and characterization of liposomes containing essential oil of Eucalyptus camaldulensis leaf. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 7*(3), 117-122.
29. Mohammed, A., Weston, N., Coombes, A., Fitzgerald, M., & Perrie, Y. (2004). Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics, 285*(1-2), 23-34. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.010
30. Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Rezayi Mokarram, R., & Mohammadifar, M.A. (2014). Physical properties of vitamin D3-loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration-sonication. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 8*(4), 175-188.
31. Mohammadpanah, M., Mojodi, E., & Ehsani, R. (2020). The synthesis and characterization of liposomal nano-carriers loading *Lavandula angustifolia* essential oil to affect breast cancerous cell-lines. *Yafteh* 22(1): 84-95.
32. Nabiuni, M., Doostikhah, S., Panahandeh, S.R., & Karimzadeh, L. (2015). Hydro-alcoholic extract of *Ziziphora tenuior* L. on polycystic ovary syndrome in Wistar rats. *Tehran University Medical Journal, 73*(5), 324-333.
33. Najafi, N., & Mohammadi Sani, A. (2020). Evaluation of physicochemical and antimicrobial properties of nanoliposomes containing Kakuti (*Ziziphora clinopodioides*) essential oil. *Food Engineering Research, 19*(68), 169-184.
34. Najaf Najafi, M., Arianmehr, A., & Mohammadi Sani, A. (2019). Encapsulation of Barije (*Ferula gummosa*) essential oil in nanoliposomal system and evaluation of its physical and antimicrobial properties. *Innovative Food Technologies, 7*(1), 71-83. https://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3573.1859
35. Nasseri M., Arouiee H., Golmohammadzadeh Sh., Jaafari M.R., & Neamati, H. (2016). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing zataria multiflora boiss essential oil by high-shear homogenization and ultrasound method. *Journal of Medicinal Plants, 15*(60), 132-141.
36. Noudoost, B., Noori, N., Amo Abedini, G., Gandomi, H., Akhondzadeh Basti, A., Jebeli Javan, A., & Ghadami, F. (2015). Encapsulation of green tea extract in nanoliposomes and evaluation of its antibacterial, antioxidant and prebiotic propertie. *Journal of Medical Plants, 14*(55), 66-78.
37. Ortan, A., Campeanu, G., Dinu-Pirvu, C., & Popescu, L. (2009). Studies concerning the entrapment of Anethum graveolens essential oil in liposomes. *Roum Biotechnol Lett, 14*(3), 4411-4417
38. Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E.J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein

concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, *111*(1), 102-109 https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.020.

39. Sezik, E., Tümen, G. & Başer, K. (1991). *Ziziphora tenuior* L., a new source of pulegone. *Flavour and Fragrance Journal, 6*(1), 101-103. https://doi.org/10.1002/ffj.2730060116
40. Shafei, M., Sharifan, A. & Aghazade, M. M. (2012). Composition of essential oil of Ziziphora clinopodioides and its antimicrobial activity on Kluyveromyces marxianus. *Journal of food technology and nutrition* 9(33): 101-107.
41. Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., & Greige-Gerges, H. (2013). Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *Journal of Liposome Research, 23*(4), 268-275. https://doi.org/10.3109/08982104.2013.819888
42. Sonboli, A., Mirjalili, M.H., Hadian, J., Ebrahimi, S.N., & Yousefzadi, M. (2006). Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. bungeana (Juz.) Rech. f. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung, 61*(9-10), 677-680. https://doi.org/10.1515/znc-2006-9-1011
43. Van Vuuren, S.F., Du Toit, L.C., Parry, A., Pillay, V., & Choonara, Y.E. (2010). Encapsulation of essential oils within a polymeric liposomal formulation for enhancement of antimicrobial efficacy. *Natural Product Communications*, *5*(9), 1401-1408. https://doi.org/10.1177/1934578X1000500912
44. Varona, S., Martin, A., & Cocero, M.A.J. (2011). Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas-saturated solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research, 50*(4), 2088-2097. https://doi.org/10.1021/ie102016r
45. Verma, R. S., Padalia, R. C. & Chauhan, A. (2012). Compositional analysis of the leaf and flower essential oils of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *15*(4), 651-656. https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644100
46. Voinea, M., & Simionescu, M. (2002). Designing of 'intelligent'liposomes for efficient delivery of drugs. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *6*(4), 465-474. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00450.x
47. Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., & Opanasopit, P. (2009). Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical Development and Technology*, *14*(6), 665-671. https://doi.org/10.3109/10837450902911937
48. Zabihi, A., Akhondzadeh Basti, A., Amoabediny, G., Khanjari, A., Tavakkoly Bazzaz, J., Mohammadkhan, F., Hajjar Bargh, A., & Vanaki, E. (2017). Physicochemical characteristics of nanoliposome garlic (*Allium sativum* L.) essential oil and its antibacterial effect on Escherichia coli O157: H7. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, *4*(1), 24-28.
49. Zhang, X., Guo, Y., Guo, L., Jiang, H., & Ji, Q. (2018). In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *BioMed Research International.* https://doi.org/10.1155/2018/2396109